

# まはたウイルス性神経壊死症不活化ワクチン（シード）

令和3年6月3日(告示第941号)新規追加

## 1 定義

シードロット規格に適合したウイルス性神経壊死症ウイルス（C型）を同規格に適合した株化細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したワクチンである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 名称

ウイルス性神経壊死症ウイルスSGEhi00-N株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2 性状

本株をまはたに注射した場合、体色黒化及び神経症状を示し死亡する。血清型はC型であり、抗C型ウイルス血清によって特異的に中和される。

まはたのウイルス性神経壊死症に対する免疫原性を有する。

#### 2.1.3 マスターシードウイルス

##### 2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、ストライプト・スネークヘッド（タイワンドジョウ科）由来細胞（以下この項において「E-11細胞」という。）又は適当と認められた培養細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

#### 2.1.4 ワーキングシードウイルス

##### 2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、E-11細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

#### 2.1.5 プロダクションシードウイルス

##### 2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、E-11細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

## 2.2 製造用材料

### 2.2.1 培養細胞

E-11細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

### 2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

### 2.2.3 マスターセルシード

#### 2.2.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

マスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20代以内でなければならない。

#### 2.2.4 ワーキングセルシード

##### 2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2の試験を行う。

#### 2.2.5 プロダクションセルシード

##### 2.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3の試験を行う。

### 2.3 原液

#### 2.3.1 プロダクションセルシードの培養

1回に処理し、培養した細胞を個別別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

#### 2.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1の細胞で培養し、適当と認められた時期に個別別培養細胞ごとに採取した培養液、そのろ液又は遠心上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3の試験を行う。

#### 2.3.3 不活化

ウイルス浮遊液をホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.4の試験を行う。

#### 2.3.4 原液

不活化ウイルス液を適当と認められた方法で調整したものを原液とする。

原液について、3.5の試験を行う。

### 2.4 最終バルク

原液を混合したものを最終バルクとする。

### 2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.6の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 製造用株の試験

#### 3.1.1 マスターシードウイルスの試験

##### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

#### 3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1及び2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

ただし、培養細胞としてEPC細胞、CHSE-214細胞、BF-2細胞及びSSN-2細胞を用い、培養温度は15℃、20℃及び25℃とする。

### 3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

#### 3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

#### 3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2 株化細胞の試験

#### 3.2.1 マスターセルシードの試験

##### 3.2.1.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.1.2 起源動物種同定試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.1.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.1.4 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.1.5 外来性ウイルス否定試験

###### 3.2.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2及び2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

ただし、培養細胞としてEPC細胞、CHSE-214細胞、BF-2細胞及びSSN-2細胞を用い、培養温度は15℃、20℃及び25℃とする。

##### 3.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.6を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.1.7 腫瘍形成性／腫瘍原性試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.7を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.2 ワーキングセルシードの試験

##### 3.2.2.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.2.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.2.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.3 プロダクションセルシードの試験

#### 3.2.3.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.3.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.3.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.3.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.3 ウイルス浮遊液の試験

#### 3.3.1 ウイルス含有量試験

##### 3.3.1.1 試験材料

###### 3.3.1.1.1 試料

検体を適当と認められた培養液で段階希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.3.1.1.2 培養細胞

E-11細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

###### 3.3.1.2 試験方法

試料を細胞浮遊液を分注したマイクロプレートに接種し、25℃で14日間培養し、観察する。

###### 3.3.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>8.9</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

### 3.4 不活化ウイルス液の試験

#### 3.4.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.4.2 不活化試験

##### 3.4.2.1 試験材料

###### 3.4.2.1.1 試料

検体から不活化剤を除去したものを試料とする。

###### 3.4.2.1.2 培養細胞

E-11細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

###### 3.4.2.2 試験方法

試料の全量を培養細胞に接種し、25℃で10日間培養し、観察する。

###### 3.4.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

### 3.5 原液の試験

#### 3.5.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.6 小分製品の試験

#### 3.6.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する液体でなければならず、異物及び異臭を認めてはならない。また、小分容器ごとの性状は均一でなければならない。

#### 3.6.2 pH測定試験

一般試験法のpH測定試験法を準用して試験するとき、pHは固有の値を示さなければならない。

### 3.6.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.6.4 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定試験法を準用するとき、適合しなければならない。

### 3.6.5 ホルマリン定量試験

適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は、0.2vol %以下でなければならない。

### 3.6.6 安全試験

#### 3.6.6.1 試験材料

##### 3.6.6.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.6.6.1.2 試験動物

水温25℃、循環式で7日間以上飼育し、異常のないことを確認した体重10～100gのまはた30尾以上を用いる。

##### 3.6.6.2 試験方法

試験動物は、24時間以上餌止めした後、1群15尾以上ずつの2群に分ける。1群の試験動物に1尾当たり注射材料0.1mLを腹腔内に注射し、試験群とする。他の1群は無接種の対照群とする。その後、それぞれ水温25℃、循環式で飼育し、20日間観察する。

##### 3.6.6.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。

### 3.6.7 力価試験

#### 3.6.7.1 試験材料

##### 3.6.7.1.1 試験動物

3.6.6の試験に用いた魚を用いる。

##### 3.6.7.1.2 中和試験用ウイルス

ウイルス性神経壊死症ウイルスSGEhi00-N株又は適当と認められた株を用いる。

##### 3.6.7.1.3 培養細胞

E-11細胞浮遊液をマイクロプレートに分注し、細胞単層が40～60%に形成されたものを用いる。

##### 3.6.7.2 試験方法

3.6.6の試験最終日の前日から一晩餌止めをする。3.6.6の試験最終日に試験群及び対照群からそれぞれ10尾以上を無作為に取り上げて採血を行い、得られた血清について中和試験を行う。

試験群と対照群の血清、参照陽性血清（付記1）及び参照陰性血清（付記2）をハンクス平衡食塩液（付記3）で希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200TCID<sub>50</sub>を含む中和試験用ウイルス液をそれぞれ等量加えて混合し、25℃で1時間処理する。この各混合液を3.6.7.1.3の培養細胞に接種し、25℃で10日間培養し、観察する。

##### 3.6.7.3 判定

CPEの完全阻止が認められた穴を数え、血清希釈倍率の50%終末点をBehrens & Kerber法で求め、この値を中和抗体価とする。試験群の中和抗体価の幾何平均値は、115倍以上でなければならない。この場合、対照群の中和抗体価の幾何平均値は、57倍未満でなければならない。また、参照血清は、所定の抗体価を示さなければならない。

### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後1年間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

付記1 参照陽性血清

ウイルス性神経壊死症ウイルス（C型）の不活化ウイルス液をまはたに注射して得た血清であって、中和抗体価320～640倍に濃度を調整したものを凍結又は凍結乾燥したもの。

付記2 参照陰性血清

健康なまはたの血清であって、中和抗体価が40倍未満のものを凍結又は凍結乾燥したもの。

付記3 ハンクス平衡食塩液

1000mL中

塩化ナトリウム 8,000 mg

塩化カリウム 400 mg

リン酸水素二ナトリウム 47.9 mg

リン酸二水素カリウム 60 mg

硫酸マグネシウム 48.8 mg

塩化マグネシウム 46.8 mg

塩化カルシウム 140 mg

グルコース 1,000 mg

精製水 残量

フェノールレッドを適量加えてもよい。